

Acción Clastogénica *in vivo* de Fenacetina y Paracetamol

S.M. SICARDI, J.L. MARTIARENA y M.T. IGLESIAS

*Instituto de la Química y Metabolismo del Fármaco,
Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA-CONICET,
Junín 956, Buenos Aires, 1113, Argentina*

RESUMEN. La actividad clastogénica de la Fenacetina, Paracetamol y *p*-Aminofenol ha sido evaluada por el Ensayo de Micronúcleos, resultando todos ellos mutágenos positivos en por lo menos dos dosis consecutivas y alejadas de la DL₅₀. Basándose en el efecto máximo producido, se postula al *p*-Aminofenol como metabolito tóxico común a ambos fármacos.

SUMMARY. "Clastogenic Activity *in vivo* of Phenacetin and Paracetamol". Clastogenic activity of Phenacetin, Acetaminophen and *p*-Aminophenol was evaluated by the Micronucleus test. All of them resulted positive mutagens in at least two consecutive doses, both far from LD₅₀. Based on the maximum effect produced, *p*-Aminophenol is postulated as a common toxic metabolite for both drugs.

INTRODUCCION

La Fenacetina (I) y el Paracetamol (II) son dos compuestos estrechamente relacionados desde el punto de vista químico y farmacológico así como en muchos de sus efectos tóxicos.

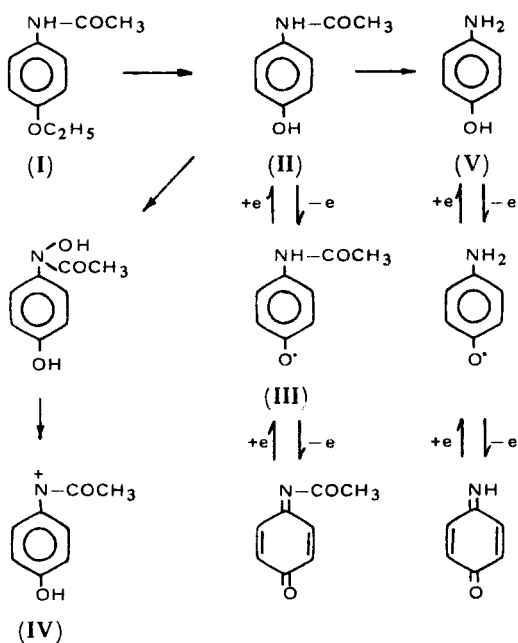
La Fenacetina o 4-etoxiacetanilida (I) ha sido usada en medicina por su efecto analgésico y antipirético durante largo tiempo¹. En los últimos 30 años se ha demostrado que induce metahemoglobinemia en el hombre y en animales de experimentación, efecto atribuible a todos los derivados de *p*-aminofenoles^{2, 3}, en especial a sus *O*-ésteres. El abuso de mezclas analgésicas conteniendo Fenacetina puede causar pielonefritis crónica y necrosis papilar, con propensión a tumo-

res de la pelvis renal y vejiga⁴⁻⁷. Grandes dosis de Fenacetina producen necrosis hepática como resultado de su biotransformación bajo el sistema Oxidasas de Función Mixta^{8, 9}.

El Paracetamol, Acetaminofeno o 4-hidroxiacetanilida (II), es uno de los metabolitos de la Fenacetina, producto de la *O*-dealquilación oxidativa que conserva sus propiedades analgésicas y cuyo uso popular como sustitutivo alternativo a la Aspirina ha ido incrementándose en la última década. En dosis altas o por tratamiento prolongado, tanto en el hombre como en animales, produce nefro y hepatotoxicidad¹⁰⁻¹⁶. Investigaciones recientes identifican al Paracetamol como metabolito, reactivo e intermediario, en el

PALABRAS CLAVE: Efecto clastogénico; Ensayo de Micronúcleos; Fenacetina; Paracetamol o Acetaminofeno; *p*-Aminofenol; Mutagenicidad; 62-44-2; 103-90-2; 123-30-8

KEY WORDS: Clastogenic effect; Micronucleus test; Phenacetin; Paracetamol or Acetaminophen; *p*-Aminophenol; Mutagenicity; 62-44-2; 103-90-2; 123-30-8



proceso de biotoxicación de la Fenacetina; no es el último toxógeno, ya que a su vez forma un metabolito que depleta Glutathion y se une parcial y covalentemente a proteínas microsomales hepáticas¹⁷. La activación tóxica de estos compuestos en el desarrollo del daño hepático y renal, a través de un radical libre^{9, 18} semiquinona (III) o vía un intermediario electrofílico (IV), puede ser común a otras acciones a largo plazo que impliquen la unión con biomoléculas de información tales como ácidos ribonucleico y desoxirribonucleico, resultando alteraciones hereditarias en el fenotipo celular tales como mutación y/o diferenciación aberrante¹⁹.

El presente trabajo tuvo por objetivo evaluar el potencial mutagénico de ambos fármacos, utilizando como método *in vivo*, el Ensayo de Micronúcleos²⁰ en un amplio intervalo de dosis. En extensión a los resultados obtenidos, se incluyó la evaluación del *p*-Aminofenol¹⁸ (V). Antecedentes sobre estudios de mutage-

nicidad de los compuestos en estudio se hallan recopilados en la Tabla 1.

MATERIALES Y METODOS

Los compuestos a ensayar, Fenacetina, Paracetamol y *p*-Aminofenol de pureza comercial, fueron recristalizados en EtOH/H₂O y controlados por TLC. Las soluciones respectivas fueron preparadas inmediatamente antes de su aplicación, en medio acuoso conteniendo un 20% de propilglicol.

10 ratones Swiss de ambos sexos, de 8-12 semanas, fueron utilizados para cada dosis (Tabla 2), sacrificándolos 30 hs después de la aplicación intraperitoneal de la droga en estudio. Como dosis más altas se eligieron aquéllas que no provocaran la muerte de ninguno de los animales tratados durante el transcurso de la experiencia. Para cada partida de animales fueron utilizados como controles 10 ratones (5 machos y 5 hembras), sacrificándolos 30 horas después de la aplicación del vehículo. De cada ratón, tratado o control, se quitaron ambos fémures y se prepararon extendidos de la médula ósea de acuerdo al método de Schmid²⁸. La presencia de micronúcleos fue analizada en 1.000 eritrocitos policromáticos, por animal, sobre portaobjetos codificados y el número de eritrocitos policromáticos micronucleados (EPCMN) fue normalizado²⁹ con la función $\theta = \arcsen \sqrt{p}$. Se comparó cada dosis normalizada con su respectivo control y se determinó la significación estadística de las diferencias mediante el test de Student, calculando el nivel justo de significación estadística $p(\epsilon)$ con un 95% de confianza. La relación entre eritrocitos policromáticos (EPC) a eritrocitos normocromáticos (EN) fue obtenida por observación de 500 eritrocitos sobre los mismos extendidos.

Tabla 1. Antecedentes sobre estudios de mutagenicidad de Fenacetina, Paracetamol y *p*-Aminofenol

Ensayo de Ames:

Agente (Nº C.A.)	Dosis máxima (mg / plato)	Cepas (TA)	Especie	Resultados s/S-9 c/S-9	Fecha
Fenacetina (62-44-2)	1	98, 100	<i>S. typhi</i>	(-) (-)	(1978) ²¹
	5	98	<i>S. typhi</i>	(-) (-)	(1979) ²²
	2,5		<i>E. coli</i>	(-) (-)	(1979) ²²
Paracetamol (103-90-2)	0,5	1538	<i>S. typhi</i>	(-) (-)	(1977) ²³
	5,3	98	<i>S. typhi</i>	(-) (-)	(1979) ²²
	7,7		<i>E. coli</i>	(-) (-)	(1979) ²²
<i>p</i> -Aminofenol (123-30-8)	500	98; 100; 1535/7	<i>S. typhi</i>	(-) (-)	(1975) ²⁴
	50	1538	<i>S. typhi</i>	(-) (-)	(1977) ²⁷
	700	98; 100	<i>S. typhi</i>	(-) (-)	(1979) ²⁵

Ensayo de Micronúcleos

Agente (Nº C.A.)	Dosis máxima (mg/kg)	Nº de dosis	Resultados	Fecha
Fenacetina (62-44-2)	0,25 (i.p.)	1	(-)	(1979) ²²
Paracetamol (103-90-2)	0,25 (i.p.)	1	(-)	(1979) ²²
<i>p</i> -Aminofenol (123-30-8)	1600 (bebida)	1	(-)	(1977) ²⁶

Tabla 2. Frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados (EPCMN)

Compuesto	(EPCMN _c ‰ ± E.S.) ¹	Dosis ² (mg/kg)	(EPCMN _t ‰ ± E.S.) ³	p(€) ⁴	EPC/EN ⁵
Fenacetina (62-44-2)	2,60 ± 0,36	100	2,50 ± 0,33	> 5 x10 ⁻¹ (0,21)	1,1:1
	2,60 ± 0,36	50	3,50 ± 0,17	< 1 x10 ⁻² (2,46)	1,1:1
	2,60 ± 0,36	1,6	3,30 ± 0,40	< 5 x10 ⁻¹ (2,03)	1,1:1
Paracetamol (103-90-2)	-	500 ^a	-	-	-
	3,10 ± 0,46	200	3,13 ± 0,46	> 5 x10 ⁻² (0,28)	1,2:1
	3,10 ± 0,46	150	6,13 ± 0,62	< 5 x10 ⁻⁴ (8,82)	1,1:1
	2,60 ± 0,36	100	6,10 ± 1,65	< 2,5x10 ⁻³ (3,34)	0,9:1
	2,60 ± 0,36	50	3,00 ± 0,53	> 5 x10 ⁻² (0,77)	1,1:1
<i>p</i> -Aminofenol (123-30-8)	2,60 ± 0,36	225	7,70 ± 0,57	< 5 x10 ⁻⁴ (6,83)	0,8:1
	2,60 ± 0,36	112	26,40 ± 2,71	< 5 x10 ⁻⁴ (15,30)	0,9:1

¹ Frecuencia de EPCM, por mil, en animales controles ± error estándar² Se utilizaron 10 ratones por dosis (5M, 5H)³ Frecuencia de EPCM, por mil, en animales tratados, ± error estándar⁴ Nivel justo de significación estadística, considerándose respuesta mutágena positiva cuando p < 0,05⁵ Relación eritrocitos policromáticos a normales^a Muere el 60% de los animales tratados

RESULTADOS

No aparecen diferencias significativas entre machos y hembras en el recuento de micronúcleos provenientes de ratones tratados, por lo cual los datos son analizados en conjunto ($n = 10$). Los resultados se describen en la Tabla 2.

La Fenacetina a 1,6 y 50 mg/kg y el Paracetamol, a 100 y 150 mg/kg, producen en los animales tratados un significativo incremento de micronúcleos en relación a los controles ($p < 0,05$) mientras que las dosis más altas ensayadas, presentan una frecuencia de micronúcleos mucho más baja y no significativa respecto a los controles ($p > 0,05$). El *p*-Aminofenol, en las 2 dosis ensayadas, presenta una frecuencia de micronúcleos significativa en relación a los controles, resultando a la dosis de 112 mg/kg un potente mutágeno. La relación entre eritrocitos policromáticos y normocromáticos no se modifica, indicando que estos compuestos no producen inhibición en el desarrollo de la progenie roja, en las dosis utilizadas.

DISCUSION

Los 3 compuestos ensayados producen en por lo menos 2 dosis consecutivas un significativo incremento de micronúcleos, considerándose de acuerdo al protocolo actualizado del ensayo²⁰ como mutágenos positivos. Comparando las dosis estadísticamente significativas, la frecuencia de micronúcleos en valores absolutos o como diferencia entre tratados y controles ($\Delta = \text{EPCMN}_t - \text{EPCMN}_c$), es mucho mayor para el *p*-Aminofenol, siguiéndole el Paracetamol y por último la Fenacetina. Esto abre la posibilidad que el *p*-Aminofenol sea un metabolito tóxico común a ambos fár-

macos, lo cual está en concordancia con la demostración reciente relacionada a la desacetilación enzimática que sufre el Paracetamol en su metabolismo¹⁸.

Por otro lado, el hecho que la Fenacetina actúe a dosis más bajas pero con menor efecto máximo, podría estar relacionado a su mayor lipofilicidad, por la cual, tiene mayor capacidad farmacocinética para llegar al sistema metabolizante pero estructuralmente, menor afinidad para ser atacada.

Un análisis de los resultados obtenidos por otros investigadores (Tabla 1) muestra que las dosis utilizadas en el Ensayo de Micronúcleos fueron insuficientes²⁰, mientras que la mayor parte de los ensayos realizados con bacterias —Ames— tuvieron un protocolo adecuado³⁰. La carcinogenicidad de la Fenacetina y el *p*-Aminofenol ha sido ampliamente demostrada por estudios epidemiológicos y ensayos a largo plazo en animales. Ambos son derivados sencillos de la anilina y como grupo no responden al Ensayo de Ames.

Trabajos realizados en nuestro laboratorio cuyos resultados están en vías de publicación, muestran que la anilina y muchos de sus derivados monosustituídos son Micronúcleos (+) y Ames (—). Esta discrepancia sugiere como posibilidades un mecanismo de acción que no es detectado en bacterias, o bien, una activación metabólica tóxica extramicrosomal.

AGRADECIMIENTOS. Deseamos expresar nuestro agradecimiento a los farmacéuticos Susana Couto y Jorge E. Ihlo por su colaboración técnica y discusión estadística, respectivamente. Este trabajo ha sido financiado por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Resol. N° 0008/86.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Hinsberg, V. y A. Kast (1887) *Centr. Klin. Med.* 25: 145-52
2. Kiese, M. (1966) *Pharmac. Rev.* 18: 1091-161
3. Beutler, E. (1969) *Pharmac. Rev.* 21: 73-103
4. Bengtsson, U., L. Angervall y H. Ekman (1968) *Scand. J. Urol. Nephrol.* 2: 145-50
5. Johansson, S. y L. Wahlquist (1977) *Acta Path. Microbiol. Scand.* 85: 768-74
6. Dubach, U.C., B. Rosner y E. Pfister (1983) *N. Engl. J. Med.* 308: 357-62
7. Wilson, D.R. y M.H. Gault (1982) *Can. Med. Assoc. J.* 127: 500-2
8. Mitchell, J.R., S.D. Nelson, S.S. Thorgeirsson, R.J. Mc Murty y E. Dybing (1976) en "Progress in Liver Disease" (H. Popper y F. Schaffner, eds.) Grune y Stratton: N. York, pág. 259
9. De Vries, J. (1981) *Biochem. Pharmacol.* 30: 399-402
10. Boyd, E.M. y G.M. Berezcky (1966) *Brit. J. Pharmacol.* 26: 606-14
11. Mitchell, J.R., D.J. Jollow, W.Z. Potter, D.C. Davis, J.R. Gillette y B.B. Brodie (1973) *J. Pharmc. Exp. Ther.* 187: 185-217
12. Nelson, S.D., A.J. Forte y R.J. Mc Murty (1978) *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 22: 61-71
13. Dahlin, D.C. y S.D. Nelson (1982) *J. Med. Chem.* 25: 885-6
14. Barker, J.D., D.J. de Carle y S. Anuras (1977) *Ann. Intern. Med.* 87: 299-301
15. Hinson, J.A., L.R. Pohl, T. Monks y J.R. Gillette (1981) *Life Science* 29: 107-116
16. Gram, T.E., L.K. Okine y R.A. Gram (1986) *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 26: 259-91
17. Aikawa, K., T. Satoh, K. Kobayashi y H. Kitagawa (1978) *J. Pharmacol.* (Japón) 28: 699-705
18. Mason, R.P. y V. Fisher (1986) *Fed. Proc.* 45: 2493-9
19. Wright, A.S. (1980) *Mutat. res.* 75: 215-41
20. Heddle, J.A., M. Hite, B. Kirkhart, K. Mavournin, J.T. Mac Gregor, G.W. Newell y M.F. Salamone (1983) *Mutat. res.* 123: 61-118
21. Shudo, K., T. Ohta, Y. Orihara, T. Okamoto, M. Nagro, Y. Takahashi y T. Seginura (1978) *Mutat. res.* 58: 367-70
22. King, M.T., H. Beikirch, K. Eckhardt, E. Gocke y D. Wild (1979) *Mutat. res.* 66: 33-43
23. Dybing, E. (1977) *Acta Pharmacol. Toxicol.* 40: 161-8
24. Mc Cann, J., E. Choi, E. Yamasaki y B.N. Ames (1975) *Proc. Nat. Acad. Sci.* (Estados Unidos) 72: 5135-9
25. Lavoie, E., T. Lorraine, E. Fow y D. Hoffmann (1979) *Mutat. res.* 67: 123-31
26. Hossak, D.J.N. y J.C. Richardson (1977) *Experientia* 33: 377-8
27. Colin Garner, R. y C.A. Nutman (1977) *Mutat. res.* 44: 9-19
28. Schmid, W. (1975) *Mutat. res.* 31: 9-15
29. Sokal, R. y J. Rohlf (1969) en "Biometry", W.H. Freeman y Co., eds., San Francisco, EE.UU.
30. L.E. Kier, D.J. Brusick, A.E. Auletta, E.S. Von Halle, M.M. Brown, V.F. Simmon, V. Dunkel, J. Mc Cann, K. Mortelmans, M. Prival, T.K. Rao y V. Ray (1986) *Mutat. res.* 168: 69-240